

TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo University of Marine Science and Technology (東京海洋大学)

養殖魚へのセレノニン投与による抗酸化能強化に関する研究

著者	東福 拓磨
学位名	修士(海洋科学)
学位授与機関	東京海洋大学
学位授与年度	2019
URL	http://id.nii.ac.jp/1342/00001878/

修士学位論文

養殖魚へのセレノネイン投与による抗酸化能強化
に関する研究

2019 年度

(2020 年 3 月)

東京海洋大学大学院
海洋科学技術研究科
海洋生命資源科学専攻
東福 拓磨

修士学位論文

養殖魚へのセレノネイン投与による抗酸化能強化
に関する研究

2019 年度

(2020 年 3 月)

東京海洋大学大学院
海洋科学技術研究科
海洋生命資源科学専攻
東福 拓磨

目次

緒言..... 1

材料と方法..... 12

結果..... 15

考察..... 17

謝辞..... 20

文献..... 21

緒言

セレンは、人や動物に対する必須な微量元素である^{1,4)}。セレン欠乏によって、酸化障害が生じて、セレン欠乏症が生じる^{1,3)}。克山病（小児の心筋症）やカシン・ベック症(地方病性変形性骨軟骨関節症)は、中国の低セレン地域で見られる。亜セレン酸塩のサプリメントが発症の予防に用いられる^{1,2)}。セレンが含まれていない完全静脈栄養療養では、心筋障害の発生が報告された⁵⁾。心臓疾患の疫学調査では、心臓疾患の罹患率と血中セレン濃度が相関し、低セレン状態で冠動脈疾患発生している^{2,6)}。フィンランドではこのようなセレン欠乏による心臓疾患死が多い²⁾。血清中のセレン濃度 45 µg/L 以下で、心臓疾患が発症することが知られている²⁾。そのほか、筋肉痛や皮膚の乾燥、肝壊死などがセレン欠乏症として知られている^{1,2)}。哺乳類の肝壊死、鳥類の滲出性体質、ヒツジ、ウシなどにおける白筋症が、セレン欠乏症であることが 1950 年代に報告された⁷⁾。

また、セレンの過剰症も知られている^{1,3)}。セレン摂取は毒性があり、爪の変形、脱毛、胃腸や神経の障害、心筋梗塞、呼吸困難、腎不全などを引き起こされる^{3,4,8)}。

日本人の栄養として、1 日のセレン摂取量は、127.3 µg である⁹⁾。米、小麦、豆など 35.7%、魚介類 32.5%、鶏卵、鶏肉、レバーおよび鶏卵 15.9%を摂取している⁹⁾。

セレンは、セレノシステイン残基として酸化還元酵素の活性中心やセレンタンパク質に含まれている³⁾。グルタチオンペルオキシターゼ(GPx)¹⁰⁻²⁶⁾、テトラヨードチロニン-5'-脱ヨウ素化酵素²⁷⁻²⁹⁾、セレノプロテイン P³⁰⁾ チオレドキシ還元酵素³¹⁾、などが生体抗酸化作用に対して重要な役割を担っていることが報告されている。

動物性食品中のセレンタンパク質のセレノシステイン残基として存在し、その消化・吸収はタンパク質の吸収と同時に行われることから、消化管吸収率は50%以上であると推定される²⁾。

穀類中のセレンはセレノメチオニンとして存在することが知られている¹⁾。鶏卵および肉類にはセレノシステインとして存在する¹⁾。これら食品中の有機態セレンの有効性は、セレン欠乏症が改善され、血中および肝臓中の GPx が最大となる活性値から推定される^{2,32)}。わが国におけるセレンの食事摂取基準は推定平均必要量が 25 (20) μg 、推奨量が 30 (25) μg 、上限量が 450 (350) μg に設定されている(数値は成人男性、かっこ内は成人女性)³³⁾。ただし、30-49歳の男性の推定平均必要量は 30 μg 、推奨量は 35 μg である³³⁾。わが国でのセレン上限量は、脱毛および爪の脆弱化と脱落がみられた中国の湖北省恩施地域の調査から得られた 1 日当たりのセレン摂取量 800 μg を参考に、1 日当たり 100-450 μg に設定されている^{33,34)}。

マグロ類の血合筋や鯨肉はセレンが含まれている³⁵⁻³⁷⁾。クロマグロのセレン含量は血液 15.2 ppm、腎臓 8.3 ppm、脾臓 7.6 ppm、表層血合筋 6.1 ppm、真層血合筋 5.9 ppm、心臓 4.4 ppm、肝臓 4.1 ppm、鰓 2.6 ppm、脳 1.4 ppm および普通筋 0.57 ppm であった。臓器によっては 4 ppm を超えるセレンが含まれていた³⁵⁻³⁷⁾。セレンを最も多く含むクロマグロ血液を材料として単離され、化学構造が決定され、このセレン化合物は、セレノネイン(2-selenyl-*N*_α,*N*_α,*N*_α-trimethyl-L-histidine)と命名された³⁸⁾。魚介類の抽出物を GPC カラムで分離し、誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)によって化学形態別に分析する方法が確立され、セレノネインは、マグロ類以外にもサバ類、ブリ類等の回遊性魚に広く分布することが明らかにされた³⁸⁾。マグロ類、カジキ類、サバ類などの血合筋や血液には 5 mg Se/kg 以上のセレノネインが分布していた³⁸⁾。クロマグロ赤血球の含有量は、51.6 mg Se/kg であった³⁹⁾。ヒトや鯨類、ウミガメの赤血球にもこの成分が含まれていた^{38,40,41)}。セレノネインはエルゴチオネインと比べて強いラジカル消去活性が検出された³⁸⁾。ラジカル消去活性を 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) に対して測定した場合、DPPH-ラジカル捕捉活性 (RS50 値)は 1.9 μM であり、水溶性ビタミン E 誘導体 Trolox®(RS₅₀=880)やエルゴチオネイン(RS₅₀=1700)と比べ高かった³⁸⁾。セレノネインは食品に含まれるもっとも強力な抗酸化物質であると考えられる³⁸⁾。

セレノネインの生理活性

セレノネインは、生体内でも抗酸化能を示すことがバイオアッセイによって解析された⁴²⁾。セレノネインは、培養細胞に投与すると、速やかに細胞内に取り込まれ、活性酸素種(ROS)の生成を抑制し、ヘムの自動酸化を抑制した⁴²⁾。ブリ活魚にセレノネインを投与した場合、セレノネインは赤血球、脾臓、血合筋、心筋などのヘムタンパク質に結合しており、ヘモグロビンおよびミオグロビンに対する酸化、すなわちメト化を抑制した⁴²⁾。セレノネインを臍帯血管内皮由来細胞(HUVEC)の培地に添加した場合、細胞増殖を促進した⁴³⁾。このようにセレノネインの生理作用は、ラジカル生成の防止、捕捉したラジカル・メチル水銀のエクソソームを介する分泌、ヘム鉄の自動酸化防止、チオール基の化学修飾、セレンタンパク質遺伝子の転写・翻訳調節、レドックス状態のシグナル、DNA 損傷修復、などが推定され、生体内でセレノネインは生体抗酸化と解毒を担うことが考えられる⁴⁴⁾。海洋では低酸素や飢餓、高水温、過酸化物の解毒などに関与すると考えられる⁴⁴⁾。

セレンによる DNA 損傷修復作用

ゼブラフィッシュ培養細胞へのセレノネインの投与によって、グルタチオンペルオキシダーゼ GPx1 および GPx4 の遺伝子発現が誘導された⁴⁵⁾。ヒト GPx1 遺伝子の転写は、p53 の活性化によって誘導されることからセレノネインは p53 を介して GPx1 遺伝子の発現を調節する可能性が考えられた⁴⁶⁾。早老症アタキシア・テラン

ジェクタシア(AT)症の培養細胞では、DNA 損傷修復機構に関わる ATM キナーゼが遺欠失しているが、セレノネインでは細胞増殖が促進されたことから、セレノネインは ATM キナーゼとは別の経路から細胞周期を調節する機序が考えられた^{43,46)}。DNA 損傷によって活性化する p53 は、核内に移行して細胞周期やアポトーシスに関する遺伝子を制御することから、これらの遺伝子はセレノネインによって調節される可能性が考えられた⁴⁶⁾。ルシフェラーゼアッセイでは、微量なセレノネインで(10 pM-10 nM)ゼブラフィッシュ GPx1a 遺伝子が誘導された。ICP-MS による機器分析と遺伝子発現系を組み合わせることでセレノネインによる遺伝子発現を解析することが可能である。魚肉由来のセレンを投与するマウス試験では、セレンは肝臓に蓄積したが、GPx 活性はあまり誘導されなかった⁴⁷⁾。セレノネインの投与試験では、亜セレン酸と比べてセレノネインによる GPx 活性の誘導は 1/10 程度と低く、セレノプロテイン P やチオレドキシシン還元酵素の発現誘導は見られなかった⁴⁶⁾。これらのことから亜セレン酸とセレノネインとでは、生理作用やその機序が大きく異なることが報告された⁴⁶⁾。

魚類におけるセレノネインの役割

クロマグロやマサバ、ブリなどの回遊魚では夏季の高水温期にヤケ肉と呼ばれる異常軟化肉がしばしば発生することが報告されている⁴⁸⁾。この現象は、漁獲時の酸欠ストレスの条件によって、ストレス応答およびオートファジーが誘

導される⁴⁸⁾。筋肉ではオートファジーとアポトーシスが生じて、白色化し、プロテアーゼ活性が上昇して、肉質が軟化する⁴⁸⁾。クロマグロのヤケ肉が生じた筋肉の部位では、正常部位と比べて、セレン含量が低かったことから、セレンが欠乏すると、ヘムの自動酸化が促進され、低酸素環境への耐性が弱まることが考えられた⁴⁶⁾。マサバでも血中セレン含量が低い個体ではヤケ肉が生じた⁴⁸⁾。養殖ブリの血合筋のセレン含量は天然魚よりも低いことから、配合飼料を給餌された養殖魚はセレン欠乏になりやすいことが推定された⁴⁹⁾。このように、産卵期の飢餓条件や飼料の種類、飼育環境、漁獲時のハンドリングによって、セレン欠乏と酸欠ストレスの生理条件が重なると、低酸素条件に対する適応能が低下し、ヤケ肉が生じやすくなることが指摘されている^{48,49)}。

養殖魚の品質は、飼料によって異なることが知られている^{48,49)}。配合飼料と生餌を給餌したヒラメの肉質を調べた研究では、ヒラメの体成分組成には差異があり、配合飼料で飼育された魚体では、血液や肝臓の過酸化物質含量が高かった⁵⁰⁾。また、養殖ブリの血合筋の褐変には、抗酸化物質の Trolox[®]の灌流投与が効果的であった⁵¹⁾。このことから飼料中に抗酸化物質を添加することによって養殖魚における抗酸化能を高め、高品質化が可能になると考えられる⁴²⁾。血合筋の褐変抑制作用があるセレノネインを養殖魚に投与すれば、魚体の過酸化物質が低減化されることが考えられる⁴²⁾。

魚類のセレン欠乏症として、タイセイヨウサケやニジマスの筋肉における障害が知られている¹⁾。セレン欠乏症として白筋症やヒトの心筋障害が報告されている^{1,2,47)}。上述のサケ肉は、白筋症と類似したセレン欠乏症であると考えられる⁴⁹⁾。セレノネインが低下した魚類を用いてセレン欠乏症へのセレノネインの重要性を研究することが可能であると考えられる。亜セレン酸やセレノメチオニン、セレントンパク質などセレン源の違いによって、セレン欠乏症の予防効果が異なることを明らかにする必要がある。

トランスポーター

セレノネインに対するトランスポーターとして、エルゴチオネントランスポーターの organic cation/carnitine transporter 1(OCTN1)が同定された^{41,52)}。細胞内取り込みの K_m 値は $10\ \mu\text{M}$ であり、文献値と比較してセレノネインに対する K_m 値が低いことから、セレノネインが有用な基質であった⁵²⁾。

ヒト OCTN1 は、腎臓近位尿細管に発現が認められ、腎臓からの薬剤の排泄因子として知られている⁵³⁻⁵⁹⁾。OCTN1 は、テトラエチルアンモニウムやカルニチン、エルゴチオネインなどの栄養成分を輸送することが知られている⁵³⁻⁵⁹⁾。ヒト OCTN1 遺伝子多型には、リウマチ、慢性大腸炎、クローン病などとの関連性が知られている⁵³⁻⁵⁹⁾。クローン病や慢性大腸炎の原因の一つとしてもセレン欠乏の関連性が推定された⁶⁰⁻⁶²⁾。OCTN1 がセレノネイン特異的なトランスポーターであり、

セレン代謝に関与することから、OCTN1 の変異や欠失とともに、魚食によるセレノネインの供給量の低下は、生体抗酸化作用に関与すると考えられる⁴⁶⁾。

セレノネインによるメチル水銀の解毒作用

マグロ類やカジキ類、キンメダイなどの肉食性の魚類やハクジラ類の筋肉には 1 ppm 程度のメチル水銀が含まれる。海洋生態系の中での食物連鎖の過程でメチル水銀が、筋肉や肝臓に蓄積される⁶³⁾。

ハクジラ類の肝臓には、数百 ppm もの高濃度の無機水銀が検出されるが、このような水銀は、水銀とセレンのモル比が 1 の無毒で安定なセレン化水銀の金属粒子である^{64,65)}。

セレンのメチル水銀毒性軽減効果は、Ganther らによって報告された⁶⁶⁾。缶詰のビンナガ肉に 20 ppm のメチル水銀を添加してもほとんどのウズラが生残した。Ralston らは、ラットに対してメチル水銀と亜セレン酸とを同時に投与した⁶⁷⁾。セレン対水銀のモル比が 0.2 以上の場合に、メチル水銀による毒性が消失した⁶³⁾。ゼブラフィッシュ胚へのメチル水銀投与(50~500 ppb)では、毒性が強く胚は死滅するが、セレノネインの存在下では毒性が著しく減弱し、細胞内の水銀蓄積は抑制された⁵²⁾。メチル水銀が胚体外へ排出される分子機序はリソゾームを介して生じる分泌作用によるものであった⁵²⁾。エキソソームはエンドサイトーシスに起源を持つ小胞であり、多胞エンドソームが細胞膜と融合した後、細胞外環境に放出される⁵²⁾。

メチル水銀曝露による酸化ストレス刺激によってスフィンゴミエリナーゼが活性化し、セラミドが生成されて、ESCRT 経路を介して、エキソソームが形成された⁵²⁾。海産哺乳類の肝臓に見られるセレン化水銀やクロカジキ筋肉に検出された無機水銀は、このようなセレノネインと OCTN1 を介するメチル水銀の解毒機構が作用した結果であると考えられた⁵²⁾。

魚食によるセレノネインの摂取

魚類および哺乳類ではセレノネインは赤血球に含まれ、血漿にはほとんど含まれなかった³⁹⁾。ヒトの血液では、赤血球画分に存在していた⁴¹⁾。鹿児島県離島での住民検診では赤血球の総セレン含量 $0.51\mu\text{g Se/g}$ 、セレノネイン含量平均値 $0.21\mu\text{g Se/g}$ であった⁴⁰⁾。魚食の頻度の高い場合に、セレノネインは魚介類中心の食事によって、生体内に取り込まれ、赤血球に濃縮して蓄積することが報告された⁴¹⁾。メチル水銀はセレノネインを介して赤血球や他の臓器に輸送される可能性が考えられた⁴¹⁾。このとき、赤血球のセレン/メチル水銀モル比は、3.5 倍から 81 倍 (平均約 42 倍) であった⁴¹⁾。

魚食由来セレンと生活習慣病予防効果との関係

糖尿病の関連から、過剰なセレノメチオニンの摂取はセレノプロテイン P の産生を促進し、インスリン抵抗性を高めることが知られている⁶⁸⁻⁷⁴⁾。センサプリメントの摂取によるガンの予防効果は見られず、糖尿病リスクが増大すること

が示された⁶⁸⁾。わが国での糖尿病に関する疫学調査では小型魚の摂取は、男性に対して、糖尿病リスクを低下させた⁷⁵⁾。セレンはガン予防効果あることが疫学調査で報告された⁷⁶⁻⁷⁸⁾。動物実験では、セレンを必要量以上摂取して GPx などセレンタンパク質の発現が高いセレン過剰な条件で、ガン予防効果が報告された^{1,2)}。そのため、セレン二次代謝物の中に、発ガン抑制作用がある低分子セレン化合物の存在が推定されている⁷⁸⁾。セレノネインは、その候補分子であり、DNA 損傷修復作用を活性化させる可能性が考えられる。

水産加工残滓からのセレノネインの抽出利用

サバ類やブリ類、マグロ類では、生鮮魚だけでなく、高度に加熱した缶詰やレトルト、しめさばなどからもセレノネインは検出されことから、セレノネイン含量の高い水産物原料として有機セレンを素材として抗酸化能を高めた食品の開発が可能である⁴⁶⁾。サバ類などの魚類の内臓には、高濃度にセレノネインが含まれていることから、水産加工残滓を回収して、セレノネインを抽出することができる。セレノネイン濃縮物を製造し、濃縮物を養魚飼料や生活習慣病予防効果のある食品素材として、利用する技術開発が可能である⁴⁶⁾。

養殖魚の生産において、カロテノイドやフェノール類などの抗酸化性物質を飼料に添加して肉質向上を図る試みが行われている⁷⁹⁻⁸⁴⁾。アスコルビン酸⁷⁹⁾、トコフェロール^{80,81)}、ポリフェノール⁸²⁾、 γ -オリザノール⁸³⁾、アスタキサンチン

⁸³⁾、フコキサンチン ⁸³⁾、ユズ抽出物 ⁸⁴⁾など、さまざまな抗酸化物質が飼料に添加されているが、これらはいずれもラジカル消去活性がない、あるいは弱い化合物である ⁴⁶⁾。セレノネインをブリ活魚への静脈投与によって動物投与試験によって、ROS 生成およびミオグロビンのメト化を抑制されたことが明らかにされた ⁴²⁾。セレノネインを養殖魚へ飼料として投与することによって、生体抗酸化作用を明らかにすることが可能である。

以上のような背景の下、本研究は、魚類由来のラジカルスカベンジャーであるセレノネインを養殖魚に給餌することによって、生体抗酸化作用と品質の向上が可能であるかどうかを検証した。養殖カンパチ *Seriola dumerili* に対してセレノネインを給餌する試験を行った。セレノネイン投与区と対照区の養殖カンパチを試料として、筋肉および内臓の総セレン含量を測定するとともに、血液のセレノネイン含量の測定、血合筋の ROS の測定、抗酸化能の指標として GPx 1 活性および酸化還元電位を測定した。また、天然カンパチにおいて酸化還元電位を測定し、養殖カンパチと比較した。

材料と方法

試料魚

カンパチ（孵化後 3 カ月）は宮崎県栽培漁業協同組合から購入した。カンパチは市販配合飼料（対照区、総セレン量 1.68 mg/kg）を与えて水産大学校魚類飼育施設で飼育した。クロマグロ内臓からセレノネイン濃縮物を抽出し、市販配合飼料に対してセレン濃度が 0.5 ppm、および 1.5 ppm となるように添加した（Table 1）。平均体重の 2% の飼料を 1 日 2 回給餌し、体重約 300 g まで 9 週間育成した（Table 2）。また、天然カンパチは市販されているものを用いた。

試料の採取

試料魚の各個体の尾柄部静脈に注射器を刺し、血液を採取した。カンパチ幼魚は肝臓、血合筋および普通筋を摘出し、フリーザーパックに入れ、-50 °C で保存した。

セレン濃度の測定

試料を入れた試験管に混酸(硝酸：過塩素酸=2:1 v/v)を加え、ドライブロックとホットプレートを使い 140–200 °C で加熱し、液量を 3 分の 1 程度に濃縮した。飽和シュウ酸アンモニウム水溶液 0.25 ml を添加し振り混ぜ、100 °C で 5 分間加熱した。水冷後、6 M 塩酸 0.25 ml を添加し振り混ぜ、100 °C で 30 分間加熱した。水冷後、0.1 M Na₂EDTA 0.25 ml を添加し振り混ぜた。5 M 水酸化ナトリ

ウムと 6 M 塩酸を用いて pH を 1.5～2.5 に調整した。蛍光試薬(1 mg/ml 2,3-ジアミノナフタレン, 0.1 M 塩酸溶液に溶解したもの)1 ml を加え、50 °C で 20 分間加熱した。水冷後、シクロヘキサン 1 ml を加え、ボルテックスミキサーで激しく混和して蛍光色素を抽出した。シクロヘキサン層の蛍光強度を分光蛍光光度計（日本分光株式会社 FP-6500）を用いて測定した(励起光波長 379 nm、蛍光波長 521 nm)。亜セレン酸水溶液を標準液として検量線を作成した。各試料の総セレン含量を定量した²⁵⁾。

セレノネインは、0.1% (w/v) Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich Japan) を含む 100 mM ギ酸アンモニウム緩衝液で平衡化した GPC カラム (Shodex GF-310 4D、直径 4.5 mm x 長さ 150 mm) を使用したクロマトグラフィーによって分離した^{39,40)}。オンラインで液体クロマトグラフィー-誘導結合プラズマ質量分析 (LC-ICP-MS) に導入し、⁸²Se を測定した。分離中、セレノネインは 200 秒の保持時間で溶出され、⁸²Se 濃度は標準試薬としてセレノネインを使用して測定した。血液 10 倍量の超純水で希釈したものを氷上でホモジナイザー (T 10 basic Ultra-Turrax、IKA Japan、東京) を使用してホモジナイズし、10,000 × g で 10 分間遠心分離した上清を回収し、⁸²Se を測定した。

酸化還元電位の測定

肉片(1 cm 厚)の血合肉表面に ORP 電極(株式会社堀場製作所製 型番 9300)を

突き刺し、押し当てた状態で電位が安定するまで静置して、酸化還元電位を測定した。

ROS の測定

ROS 含量として、ヒドロキシラジカル濃度をヒドロキシフェニルフルオロセイン(HPF,積水メディカル,東京)を用いて測定した。血合筋に対し 5 倍量の超純水で希釈し、ホモジナイズし、10,000×g、20 分で遠心分離し、上清を回収した。上清 1 μ l に対して超純水で 1000 倍希釈した HPF 溶液 を 1 ml 量混合して、室温で 10 分間反応させた。この反応液を分光蛍光光度計（日本分光株式会社 型番 FP-6500）を用いて励起波長 490 nm および蛍光波長 515 nm で蛍光強度 (arbitrary unit, AU)を計測し、ROS レベルの指標として用いた。

GPx 活性の測定

GPx 活性は、基質の還元反応によって生成した酸化型 GSH を還元型に還元するためにグルタチオンレダクターゼが消費した NADPH 量を測定した⁸⁴⁾。測定のため 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0), 10 mM アジ化ナトリウム, 10 mM GSH, 0.25 U/ml グルタチオンレダクターゼおよび 15 mM NADPH を含む反応液を 37°C でインキュベートした。NADPH の蛍光強度(蛍光 460 nm/励起光 360 nm)を蛍光分光光度計(ベルトールジャパン株式会社)で測定した。酵素活性は 37°C で 1 分間に 1 μ mol の NADPH を酸化する活性を 1 unit として定義した。

結果

カンパチ組織におけるセレン濃度の測定

血合筋、普通筋、肝臓および血液の総セレン含量を示す (Table 3)。血合筋のセレン濃度は対照区 0.17 mg/kg、セレノネイン 0.5 ppm 投与区 0.41 mg/kg、1 ppm 試験区 0.37 mg/kg であった。普通筋のセレン濃度は対照区 0.24 mg/kg、セレノネイン 0.5 ppm 投与区 0.27 mg/kg、セレノネイン 1 ppm 投与区 0.27 mg/kg であった。肝臓のセレン濃度は対照区 1.13 mg/kg、セレノネイン 0.5 ppm 投与区 1.29 mg/kg およびセレノネイン 1 ppm 投与区 1.26 mg/kg であった。血液のセレン濃度は対照区 0.85 mg/kg、セレノネイン 0.5 ppm 投与区 1.74 mg/kg およびセレノネイン 1 ppm 投与区 3.77 mg/kg であった。血合筋と肝臓、血液の総セレン含量は、セレノネインの添加量に依存して増加した。

血液のセレノネイン含量を Table 4 に示した。血液のセレノネイン含量は対照区 0.06 mg/kg、セレノネイン 0.5 ppm 投与区 0.26 mg/kg およびセレノネイン 1 ppm 投与区 0.39 mg/kg であった。このように、セレノネイン含有餌料の 9 週間の飼育において、セレノネイン含量は対照区と比較してセレノネイン 0.5 ppm 投与区は 4.3 倍、セレノネイン 1 ppm 投与区は 6.5 倍に増加した (Figure 1)。

酸化還元電位の測定

筋肉の生体抗酸化作用の指標として筋肉に電極を突き刺し、酸化還元電位を

測定した (Table 5)。対照区が -102.9 mV に対し、セレノネイン 0.5 ppm 投与区が -122.5 mV 、セレノネイン 1 ppm 投与区が -133.5 mV 、天然魚は -173.9 mV であった。これらの結果から、セレノネイン含有餌料 9 週間の飼育において、セレノネイン含量は対照区と比較してセレノネイン 0.5 ppm 投与区は 1.1 倍、セレノネイン 1 ppm 投与区は 1.2 倍増加した。また、セレン含量と酸化還元電位の間に負の相関性が見られた ($r=-0.714$) (Figure 2)。

ROS の測定

飼育 9 週間目の血合筋の ROS 測定結果を示す (Figure 3)。ROS レベルは、対照区は 4.95 (AU) 、セレノネイン 0.5 ppm 投与区は 3.52 (AU) 、セレノネイン 1 ppm 投与区は 3.46 (AU) であった。

GPx 活性の測定

飼育 9 週間目の血液、血合筋の GPx 活性の測定結果を示す (Figure 4)。血液の GPx 活性は対照区が 18.7 (U/g) 、 0.5 ppm 投与区は 19.3 (U/g) およびセレノネイン 1 ppm 投与区は 21.7 (U/g) であった。

考察

セレノネインは、魚類の由来のセレン含有化合物であり、回遊魚の低酸素適応に関与することからセレン欠乏は、血合肉の褐変や肉質軟化の原因となることが考えられる^{36,37,48,85)}。養殖魚と天然魚の肉質を比較した場合、養殖魚は、筋肉中のセレン含量が低く、一種のセレン欠乏状態にあることが推定されたことから、従来の配合飼料の給餌条件では、養殖魚のセレン欠乏状態をもたらし、酸欠や感染などのストレス条件に対して、耐性が低下する可能性が推定される^{49,85)}。そこで、セレノネインを給餌して、養殖魚の生体抗酸化作用を強化することを試した。セレノネイン投与区と対照区のカンパチを試料として、筋肉中、肝臓および血液にセレノネインの蓄積が確認できた。酸化還元電位は、対照区が -102.9 mV だったのに対して、セレノネイン 0.5 ppm 投与区の筋肉の酸化還元電位は -122.6 mV、セレノネイン 1 ppm 投与区の筋肉の酸化還元電位は -133.5 mV だった。ROS 量は、対照区が 3.97 AU だったのに対して、セレノネイン 0.5 ppm 投与区の筋肉の ROS は 3.48 AU、セレノネイン 1 ppm 投与区の筋肉の ROS は 3.37 AU だった。これらのことからセレノネインの餌料からの摂取によって、セレノネインは体内に取り込まれ、各組織に蓄積した結果、酸化還元電位および ROS が低下したことが明らかとなった。これらのこと、すなわち酸化還元電位および ROS の低下から、セレノネイン摂取による生体抗酸化作用の増強が確認された。

すなわち、ORP 電極による筋肉の酸化還元電位の測定によってセレノネインによる生体抗酸化作用を直接定量的に測定する分析手法を開発することができた。また、血合筋 ROS 含量が対照区と比較してセレノネイン投与区が低下したことによって、生体抗酸化作用の増強を裏付けられた。天然魚の場合、酸化還元電位は -173.9 mV と養殖魚よりも低いことが分かった。

セレノネインは、ブリ活魚への静脈投与により、活性酸素の生成およびミオグロビンのメト化を抑制するという報告がある⁴²⁾。このセレン化合物は Trolox やセレノネインの硫黄アナログのエルゴチオネインと比べて、強いラジカル消去活性を有する³⁸⁾。このように配合飼料にセレノネインを添加することによって、天然魚のセレノネイン蓄積レベルに近づけることが可能であり、その結果、生体抗酸化作用が向上し、セレン欠乏による酸化ストレスが抑制され、ヤケ肉の発現が予防できることが考えられた。今回の試験によってセレノネイン投与区にセレノネインの蓄積がみられたため、この手法によって養殖魚のセレン欠乏を解消することができると考えられる。セレノネインを含む魚介類の加工残滓を養魚餌料に利用することによって、セレノネインの摂取が可能であり、養殖魚の抗酸化に関する機能性の向上が期待できる。セレノネインの蓄積効率を算出した結果、配合飼料から血液への蓄積効率はセレンあたり 3.0 倍であった。セレノネイン含有餌料 9 週間の投与によって、セレノネインは十分蓄積されることがわ

かった。さらに高濃度のセレノネインを餌料に添加することによって効率良く
セレノネインを摂取させることができる。

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導をいただいた山下倫明教授に感謝する。飼育法をご教授いただいた近藤昌和教授に感謝する。

文献

- 1) Combs, Gerald. F., Jr. The Role of Selenium in Nutrition. Academic Press, New York, NY. 1986.
- 2) 姫野誠一郎. セレン, ミネラル/微量元素の栄養学(鈴木継美・和田攻編), 第一出版, 1994, p. 423-445.
- 3) Himeno, Seiichiro and Imura, Nobmasa. New aspects of physiological and pharmacological roles of selenium. *J. Health Sci.* 2000, 46, p. 1-6.
- 4) 山下由美子. 魚類に含まれる有機セレン化合物の構造と機能に関する研究. 2012.
- 5) van Rij, A. M., Tomson, C. D., McKenzie, L. J. M., and Robinson, M. F. Selenium deficiency in total parenteral nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 1979, 32, p. 2076-2085.
- 6) Salonen, J.T., Alfthan, G., Huttunen, J. K., Pikkarainen, J., and Puska, P. Association between cardiovascular death and myocardial infarction and serum selenium in a watched-pair longitudinal study. *Lancet.* 1982, 2, p. 175-179.
- 7) 山口賢次 微量元素欠乏症とその把握法, ミネラル/微量元素の栄養学(鈴木継美・和田攻編), 第一出版, 東京. 1994, p. 129-130.
- 8) Wilber, C. G. Toxicology of selenium: a review. *Clin. Toxicol.* 1980, 17, p. 171-230.

- 9) 鈴木継美, 今井秀樹, 小林香苗, 本郷哲郎, 柏崎浩, 大塚柳太郎, 鈴木久乃, 石井裕美 日本人のセレン摂取量. 日本栄養・食糧学会誌. 1988, 41, p. 91–102.
- 10) Awasthi, Y. C., Beutler, E., and Srivastava, S. K. Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 1975, 250, p. 5144–5149.
- 11) Bagnyukova, T. V., Storey, K. B., and Lushchak, V. I. Adaptive response of antioxidant enzymes to catalase inhibition by aminotriazole in goldfish liver and kidney. *Comp. Biochem. Physiol.* 2005, B142, p. 335–341.
- 12) Braddon, S. A., McIlvaine, C. M., and Balthrop, J. E. Distribution of GSH and GSH cycle enzymes in black sea bass (*Centropristis striata*). *Comp Biochem Physiol.* 1985, B80, p. 213–216
- 13) Carmagnol, F., Sinet, P. M., and Jerome, H. Selenium-dependent and nonselenium-dependent glutathione peroxidases in human tissue extracts. *Biochim. Biophys. Acta.* 1983, 759, p. 49–57.
- 14) Combs, Gerald. F., Jr. Impact of selenium and cancer-prevention findings on the nutrition-health paradigm. *Nutr. Cancer.* 2001a, **40**, p. 6–11.
- 15) Kai, N., Tsuda, T., Sakai, T., Murata, H., Hamada, M., Tanoue, Y., and Nagai, T.

- Glutathione peroxidase activity in the blood of tunas and marlins. *Fish. Sci.* 1995, **61**, p. 867–870.
- 16) Kolayi, S., Arikan, M., Uzunosmanoglu, D., Vanizor, B., Kiran, E., and Sagban, R. Comparative studies on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in different fish species. *Tr. J. Zool.* 1997, **21**, p. 171–173.
- 17) Mills, G. C. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.* 1957, **229**, p. 189–197.
- 18) Mills, G. C. The purification and properties of glutathione peroxidase of erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 1958, **234**, p. 502–506.
- 19) Nagai, T., Yukimoto, T., and Suzuki, N. Glutathione peroxidase from the liver of Japanese sea bass *Lateolabrax japonicus*. *Z. Naturforsch.* 2002, **57c**, p. 172–176.
- 20) Nakano, T., Sato, M., and Takeuchi, M. Glutathione peroxidase of fish. *J. Food Sci.* 1992, **57**, p. 1116–1119.
- 21) Perez-Campo, R., Lopez-Torres, M., Rojas, C., Cadenas, S., and Barja, G. A comparative study of free radicals in vertebrates—I. antioxidant enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 1993, **B105**, p. 749–755.
- 22) Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., and Hoekstra, W. G. Prevention of

oxidative damage to rat erythrocytes by dietary selenium. *J. Nutr.* 1972, **102**, p. 689–696.

- 23) Thompson, J. L., Thomas, P. M., and Schuller, K. A. Purification and properties of a glutathione peroxidase from Southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) liver. *Comp. Biochem. Physiol.* 2006, B144, p. 86–93.
- 24) Watanabe, F., Goto, M., Abe, K., and Nakano, Y. Glutathione peroxidase activity during storage of fish muscle. *J. Food Sci.* 1996, 61, p. 734–735.
- 25) Bell, J. G., Cowey, C. B., and Youngson, A. Rainbow trout liver microsomal lipid peroxidation. 1984.
- 26) Yamashita Y, Yabu T, Touhata K, Yamashita M. Purification and characterization of glutathione peroxidase 1 in the red muscle of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Fish. Sci.* 2011, 78, p. 407-413
- 27) Arthur, J. R., Nicol, F., and Beckett, G. J. Hepatic iodothyronine 5'-deiodinase. The role of selenium. *Biochem J.* 1990, **272**, p. 537–540.
- 28) Behne, D., Kyriakopoulos, A., Meinhold, H., and Kohrie, J. Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990, 173, p. 1143–1149.
- 29) Berry, M. L., Banu, L., and Larsen, P. R. Type I iodothyronine deiodinase is

a selenocysteine-containing enzyme. *Nature*. 1991, **349**, p. 438–440.

- 30) Burk, R. F. and Hill, K. E. Selenoprotein P. A selenium-rich extracellular glycoprotein. *J. Nutr.* 1994, 124, p. 1891–1897.
- 31) Mustacich, D. and Powis, G. Thioredoxin reductase. *Biochem. J.* 2000, 346, 1, p. 1–8.
- 32) Sunde, R.A., Raines, A.M., Barnes, K.M., Evenson, J.K. Selenium status highly regulates selenoprotein mRNA levels for only a subset of the selenoproteins in the selenoproteome. *Biosci. Rep.* 2009, 29, 329–338.
- 33) 厚生労働省 日本人の食事摂取基準 . 2004;
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2004/11/h1122-2.html>
- 34) 経済産業省 セレン及びその化合物, 有害性評価書, Ver. 0.4, No.128(高月峰夫編), 新エネルギー・業技術総合開発機構 .
2006; <http://www.meti.go.jp/committee/materials/downloadfiles/g71205c05j.pdf>(2011/01/14).
- 35) 有馬郷司, 長倉克男 歯クジラ類の水銀およびセレン含量. 日水誌. 1979, 45, p. 623–626.
- 36) 山下由美子. 魚肉中の微量必須元素に関する食品化学的研究, 平成 5 年度水産物利用加工試験研究成績・計画概要集, 水産庁中央水産研究所. 1994, p.

10-11.

- 37) 山下由美子. 魚肉中の微量必須元素に関する食品化学的研究, 平成 8 年度水産物利用加工試験研究成績・計画概要集, 水産庁中央水産研究所. 1997, p. 28-29.
- 38) Yamashita, Yumiko and Yamashita, Michiaki: Identification of a novel selenium-containing compound, selenoneine, as the predominant chemical form of organic selenium in the blood of bluefin tuna. *J Biol Chem*. 2010, 285: p. 18134-18138.
- 39) Yamashita Y, Amlund H, Suzuki T, Hara T, Hossain MA, Yabu T, Touhata K, Yamashita M: Selenoneine, total selenium, and total mercury content in the muscle of fishes. *Fish Sci*. 2011, 77, p. 679-686.
- 40) Anan, Yasumi. Ishiwata, Kazuya. Suzuki, Noriyuki. Tanabe, Shinsuke. and Ogra, Yasumitsu. Speciation and identification of low molecular weight selenium compounds in the liver of sea turtles. *J Anal At Spectrom*. 2011, 26, p. 80-85.
- 41) Yamashita M, Yamashita Y, Ando T, Wakamiya J, Akiba S. Identification and determination of selenoneine, 2-selenyl-N α ,N α ,N α -trimethyl-L-histidine, as the major organic selenium in blood cells in a fish-eating population on remote Japanese islands. *Biol Trace Elem Res*. 2013, 156, p. 36-44.
- 42) 山下由美子, 鈴木珠水, 原竜朗, 今村伸太郎, モハメド A. ホセイン, 藪健

- 史, 東畑顕, 山下倫明.セレン含有抗酸化物質セレノネインの静脈投与によるブリ血合筋のメト化抑制.日水誌. 2013, 79, p. 863-868.
- 43) 山下由美子,山下倫明, 藪健史: 新規セレン含有化合物. 2011; 特開 2011-121914.
- 44) 山下倫明, 今村伸太郎, 山下由美子: 水産物のメチル水銀とセレン. 化学と生物. 2012, 50, p. 807-817.
- 45) Tan M, Li S, Swaroop M, Guan K, Oberley LW, Sun Y. Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53. J Biol Chem. 1999, 274, p. 12061-12066, 1999.
- 46) 山下倫明, 今村伸太郎, 藪健史,石原賢司 山下由美子. 水産物由来のセレン: セレノネインの栄養生理機能. Biomed Res Trace Element. 2013, 24, p. 176-184.
- 47) 吉田宗弘:日本人のセレン摂取と血中セレン濃度. 日本栄養・食糧学会誌. 1992, 45, p. 485-494.
- 48) 山下倫明: 6章 漁獲ストレスと生体反応. 今野久仁彦, 落合芳博, 福田裕編: 生鮮マグロ類の高品質管理, 恒星社厚生閣, 東京, 2010, p. 81-94.
- 49) 杉田毅, 山下倫明: 魚類の個体および細胞レベルのストレス反応. 福田裕, 渡部終五編: 水産学シリーズ 172 巻, 沿岸漁獲物の高品質化: 短期蓄養と流

通システム, 恒星社厚生閣, 東京. 2012, p. 121-127.

- 50) 井岡久, 山中英明: 餌料の異なる養殖ヒラメの品質評価. 日水誌. 1997, 63, p. 370–377.
- 51) Sohn J, Ushio H, Ishida N, Yamashita M, Terayama M, Ohshima T: Effect of bleeding treatment and perfusion of yellowtail on lipid oxidation in post-mortem muscle. Food Chem. 2007, 104, p. 962–970.
- 52) Yamashita M, Yamashita Y, Suzuki T, Kani Y, Mizusawa N, Imamura S, Takemoto K, Hara T, Hossain MA, Yabu T, Touhata K: Selenoneine, A novel selenium-containing compound, mediates detoxification mechanisms against methylmercury accumulation and toxicity in zebrafish embryo. Marine Biotech. 2013, 15, p. 559-570.
- 53) Tamai I, Yabuuchi H, Nezu J, Sai Y, Oku A, Shimane M, Tsuji A. Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. FEBS Lett. 1997, 419, p. 107-111.
- 54) Yabuuchi H, Tamai I, Nezu J, Sakamoto K, Oku A, Shimane M, Sai Y, Tsuji A: Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations. J Pharmacol Exp Ther. 1999, 289, p. 768-773.

- 55) Tamai I, Nakanishi T, Kobayashi D, China K, Kosugi Y, Nezu J, Sai Y, Tsuji A: Involvement of OCTN1 (SLC22A4) in pH-dependent transport of organic cations. *Mol Pharm.* 2004, 1, p. 57-66.
- 56) Kobayashi D, Aizawa S, Maeda T, Tsuboi I, Yabuuchi H, Nezu J, Tsuji A, Tamai I: Expression of organic cation transporter OCTN1 in hematopoietic cells during erythroid differentiation. *Exp Hematol.* 2004, 32, p. 1156-1162.
- 57) Grundemann D, Harlfinger S, Golz S, Geerts A, Lazar A, Berkels R, Jung N, Rubbert A, Schomig E: Discovery of the ergothioneine transporter. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005, 102, p. 5256-5261.
- 58) Urban TJ, Brown C, Castro RA, Shah N, Mercer R, Huang Y, Brett CM, Burchard EG, Giacomini KM: Effect of genetic variation in the novel organic cation transporter, OCTN1, on the renal clearance of Gabapentin. *Clin Pharmacol Ther.* 2008, 83, p. 416-421.
- 59) Kato Y, Kubo Y, Iwata D, Kato S, Sudo T, Sugiura T, Kagaya T, Wakayama T, Hirayama A, Sugimoto M, Sugihara K, Kaneko S, Soga T, Asano M, Tomita M, Matsui T, Wada M, Tsuji A: Gene knockout and metabolome analysis of carnitine/organic cation transporter OCTN1. *Pharm Res.* 2010, 27, p. 832–840.
- 60) Taubert D, Grimberg G, Jung N, Rubbert A, Schömig E: Functional role of the 503F

variant of the organic cation transporter OCTN1 in Crohn's disease. *Gut*. 2005, 54, p. 1505–1506.

- 61) Rannem T, Ladefoged K, Hylander E, Hegnhj J, Jarnum S: Selenium status in patients with Crohn's disease. *Am J Clin Nutr*. 1992, 56, p. 933-937.
- 62) Xuan C, Zhang BB, Yang T, Deng KF, Li M, Tian RJ: Association between OCTN1/2 gene polymorphisms (1672C-T, 207G-C) and susceptibility of Crohn's disease: a meta-analysis. *Int J Colorectal Dis*. 2012, 27, 11-19.
- 63) 山下倫明, 今村伸太朗, 山下由美子: 水産物のメチル水銀とセレン. *化学と生物*. 2012, 50, p. 807-817.
- 64) 板野一臣: 海産魚介類等に含まれる水銀とそのリスク評価. *生活衛生*. 2007, 51, p. 57-65.
- 65) Ng P-S, Ji H, Matsumoto K, Yamazaki S, Kogure T, Tagai T, Nagasawa H: Striped dolphin detoxifies mercury as insoluble Hg(S, Se) in the liver. *Proc Japan Acad Ser. B*. 2001, 77, p. 178-183.
- 66) Ganther, H. E., Goudie, C., Sunde, M., Kopeckey, M., Wagner, S., and Hoekstra, W. Selenium: relation to decreased toxicity of methylmercury added to diets containing tuna. *Science*. 1972; **175**, 1122–1124.
- 67) Ralston NVC, Ralston CR, Blackwell JL, Raymond LJ. Dietary and tissue selenium

in relation to methylmercury toxicity. *Neurotoxicology*. 2008, 29, p. 802–811.

- 68) Stranges S, Marshall JR, Natarajan R, Donahue RP, Trevisan M, Combs GF, Cappuccio FP, Ceriello A, Reid ME: Effects of long-term selenium supplementation on the incidence of type 2 diabetes: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2007, 147, p. 217-223.
- 69) Rayman MP, Stranges S. Epidemiology of selenium and type2 diabetes: Can we make sense of it *Free Radic Biol Med*. 2013, 65, p. 1557-1564.
- 70) Ezaki O: The insulin-like effects of selenite in rat adipocytes. *J Biol Chem*. 1990, 265, p. 1124–1128.
- 71) Steinbrenner H, Speckmann B, Pinto A, Sies H: High selenium intake and increased diabetes risk: experimental evidence for interplay between selenium and carbohydrate metabolism. *J Clin Biochem Nutr*. 2011, 48, p. 40–45.
- 72) Chung SS, Kim M, Youn BS, Lee NS, Park JW, Lee IK, Lee YS, Kim JB, Cho YM, Lee HK, Park KS: Glutathione peroxidase 3 mediates the antioxidant effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human skeletal muscle cells. *Mol Cell Biol*. 2009, 29, p. 20–30.
- 73) Wang XD, Vatamaniuk MZ, Wang SK, Roneker CA, Simmons RA, Lei XG: Molecular mechanisms for hyperinsulinaemia induced by overproduction

of selenium-dependent glutathione peroxidase-1 in mice. *Diabetologia*. 2008, 51, p. 1515–1524.

- 74) Misu H, Takamura T, Takayama H, Hayashi H, Matsuzawa-Nagata N, Kurita S, Ishikura K, Ando H, Takeshita Y, Ota T, Sakurai M, Yamashita T, Mizukoshi E, Yamashita T, Honda M, Miyamoto K, Kubota T, Kubota N, Kadowaki T, Kim HJ, Lee IK, Minokoshi Y, Saito Y, Takahashi K, Yamada Y, Takakura N, Kaneko S: A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. *Cell Metab*. 2010, 12, p. 483-495.
- 75) Nanri A, Mizoue T, Noda M, Takahashi Y, Matsushita Y, Poudel-Tandukar K, Kato M, Oba S, Inoue M, Tsugane S: Japan Public Health Center-based Prospective Study Group. Fish intake and type 2 diabetes in Japanese men and women: the Japan Public Health Center-based Prospective Study. *Am J Clin Nutr*. 2011, 94, p. 884-891.
- 76) Fernandez E, Chatenoud L, La Vecchia C, Negri E, Franceschi S. Fish consumption and cancer risk. *Am J Clin Nutr*. 1999; 70: 85–90.
- 77) Mozaffarian D. Fish, mercury, selenium and cardiovascular risk: current evidence and unanswered questions. *Int J Environ Res Public Health*. 2009; 6: 1894–1916.
- 78) Jackson M, Combs GF: Selenium and anticarcinogenesis: underlying

mechanisms.Curr Opin Clin Nutr Met Care. 2008; 11:718-726.

- 79) 石橋泰典.イシダイ飼料の至適アスコルビン酸添加量.日水誌. 1992, 58, p. 267-270.
- 80) 関屋朝裕,村田 寿,境 正,山内 清,山下清海, 宇川正治,金井 学,嶋田元且.高 α -トコフェロール魚粉餌料給餌によるブリ組織の脂質過酸化抑制および生体防御能強化の試み.日水誌. 1991, 57, p. 287-292.
- 81) 秋元淳志.10.2 飼料原料.「改訂魚類の栄養と飼料」(渡邊 武編)恒星社厚生閣,東京. 2009, p. 284-325.
- 82) Tsukui T, Konno K, Hosokawa M, Maeda H, Sashima T, Miyashita K. Fucoxanthin and fucoxanthinol enhance the amount of docosahexaenoic acid in the liver of KKAy obese/diabetic mice. J. Agric. Food Chem. 2007, 55, p. 5025- 5029.
- 83) 長阪玲子,風間貴充,潮 秀樹,坂本浩志,坂本憲一. γ -オリザノールの添加がアスタキサンチン含有飼料によるブリ切り身の変色抑制作用に及ぼす影響. 日水誌. 2011, 77, p. 1101-1103.
- 84) 深田陽久,橋口智美,柏木丈弘,妹尾歩美,高桑史明, 森岡克司,沢村正義,益本俊郎.ユズ果汁添加飼料を給与したブリにおける血合筋の褐変抑制と筋肉中からのユズ香気成分の検出.日水誌. 2010, 76, p. 678-685.
- 85) 山下由美子・山下倫明:魚類の低酸素適応におけるセレンの役割. アクアネ

ット. 2014, 1, p. 46-51.

Figure legends

Figure 1. Speciation analysis of organic selenium in the blood of amberjack by LC-ICP-MS

Selenium compounds were separated with a Shodex GF-310 4D (4.5 mm × 150 mm, shodex, Tokyo, Japan), equilibrated with 0.1 mol / L ammonium formate buffer containing 0.1% Igapal. The mobile phase was delivered at 0.5 mL / min isocratically, and selenium was detected using HPLC-ICPMS (Agilent 7500 Series, Agilent, Tokyo Japan) monitoring ^{82}Se .

Figure 2. Relationship between ORP and selenium contents in the tissues of amberjack

A correlation was analyzed between redox potential and total selenium content. There was a strong correlation between ORP and total selenium contents in blood and red muscle (Se in red muscle $r=-0.398$, Se in blood $r=-0.714$).

Figure 3. ROS levels in the red muscle

ROS level was determined with a fluorescent probe of HPF.

Figure 4. Glutathione peroxidase (GPx) activity in the red muscle.

Table 1. Total selenium content in diet

diet	Total selenium content in diet* (mg/kg)
control	1.68 ± 0.12
selenoneine 0.5 ppm Se	2.19 ± 0.29
selenoneine 1 ppm Se	2.51 ± 0.05

*shown average and standard deviation.

Table 2. Body weight change in amberjack during feeding experiment for 9 weeks.

diet	body weight (g)			
	Initial control	3 weeks	6 weeks	9 weeks
control	61.1 ± 5.3	123.8 ± 24.0	190.7 ± 44.7	326.4 ± 59.5
selenoneine 0.5 ppm Se		113.3 ± 14.5	176.3 ± 43.6	294.2 ± 38.0
selenoneine 1 ppm Se		106.7 ± 11.8	177.5 ± 17.9	279.0 ± 34.9

*shown average and standard deviation.

Table 3. Total selenium content in each tissue of amberjack.

	initial control	3 weeks	6 weeks	9 weeks
red muscle				
control	0.09 ± 0.04	0.31 ± 0.05	0.03 ± 0.03	0.17 ± 0.08
selenoneine 0.5 ppm Se		0.31 ± 0.04	0.18 ± 0.04	0.41 ± 0.30
selenoneine 1 ppm Se		0.33 ± 0.04	0.31 ± 0.06	0.37 ± 0.14
white muscle				
control	0.13 ± 0.03	0.29 ± 0.02	0.19 ± 0.05	0.24 ± 0.08
selenoneine 0.5 ppm Se		0.28 ± 0.04	0.17 ± 0.04	0.27 ± 0.04
selenoneine 1 ppm Se		0.33 ± 0.03	0.20 ± 0.06	0.27 ± 0.04
hepatopancreas				
control	0.86 ± 0.12	0.89 ± 0.16	0.97 ± 0.23	1.13 ± 0.25
selenoneine 0.5 ppm Se		0.90 ± 0.18	1.08 ± 0.25	1.29 ± 0.29
selenoneine 1 ppm Se		1.05 ± 0.12	1.42 ± 0.14	1.26 ± 0.39
blood				
control diet	0.32 ± 0.11	0.45 ± 0.17	0.71 ± 0.23	0.85 ± 0.22
selenoneine 0.5 ppm Se		0.58 ± 0.16	1.71 ± 0.38	1.74 ± 0.70
selenoneine 1 ppm Se		1.02 ± 0.20	2.62 ± 0.54	3.77 ± 0.57

*shown average and standard deviation.

Table 4. Selenoneine content in the whole blood after 9 weeks feeding experiments

diet	selenoneine content
	(mg Se/kg)
control	0.06 ± 0.06
selenoneine 0.5 ppm Se	0.26 ± 0.07
selenoneine 1 ppm Se	0.39 ± 0.09

*shown average and standard deviation.

Table 6. Oxidation-reduction potential in the red muscle of amberjack

fish	Individual number	ORP (mV)
cultured fish with artificial diet		
control	10	-102.9 \pm 12.4
selenoneine 0.5 ppm Se	9	-122.6 \pm 4.8
selenoneine 1 ppm Se diet	10	-133.5 \pm 4.4
wild fish	7	-173.9 \pm 18.4

*shown average and standard deviation.

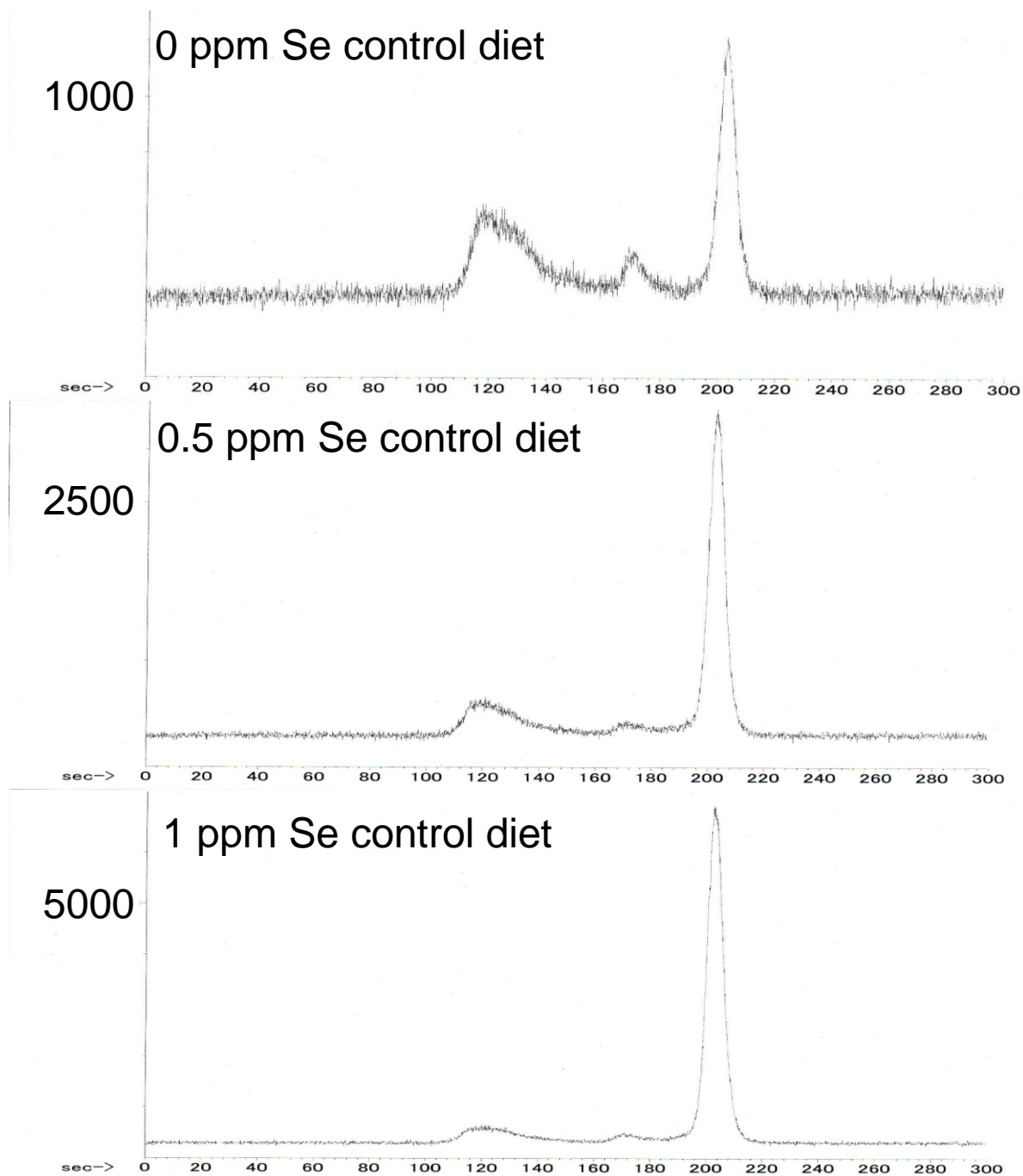


Figure 1
Tohfuku et al.

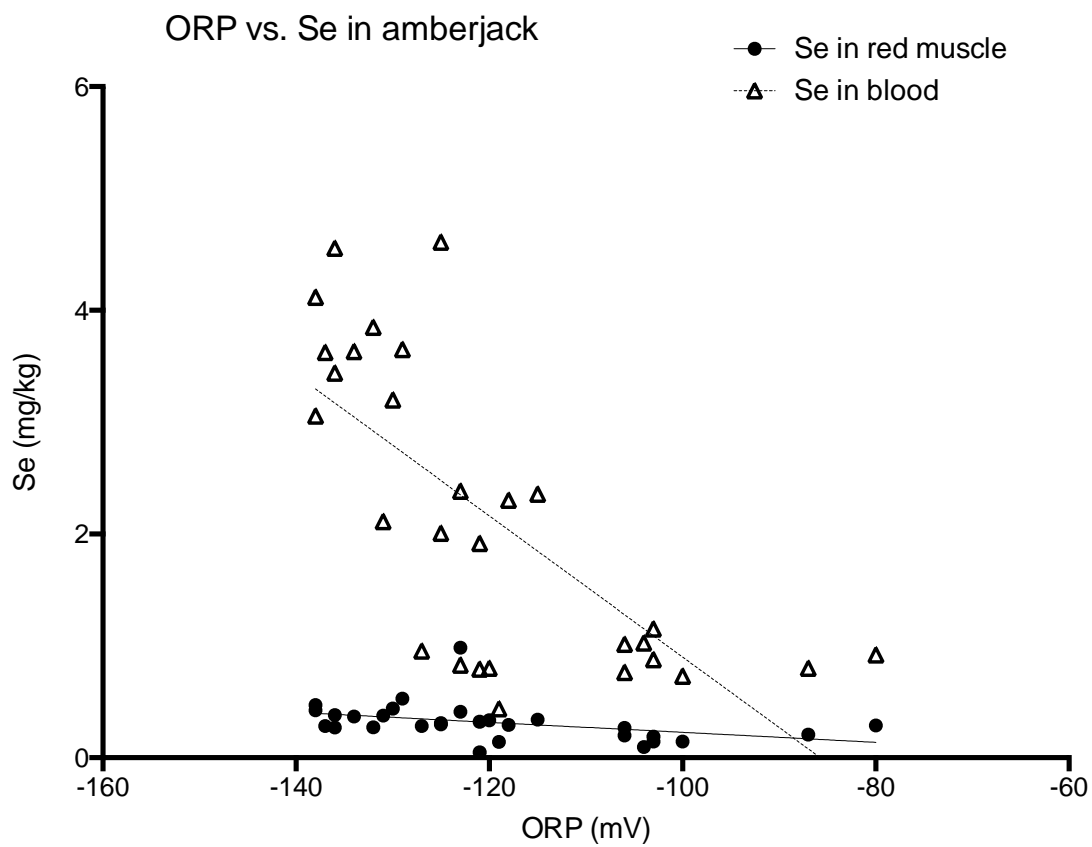


Figure 2
Tohfuku et al.

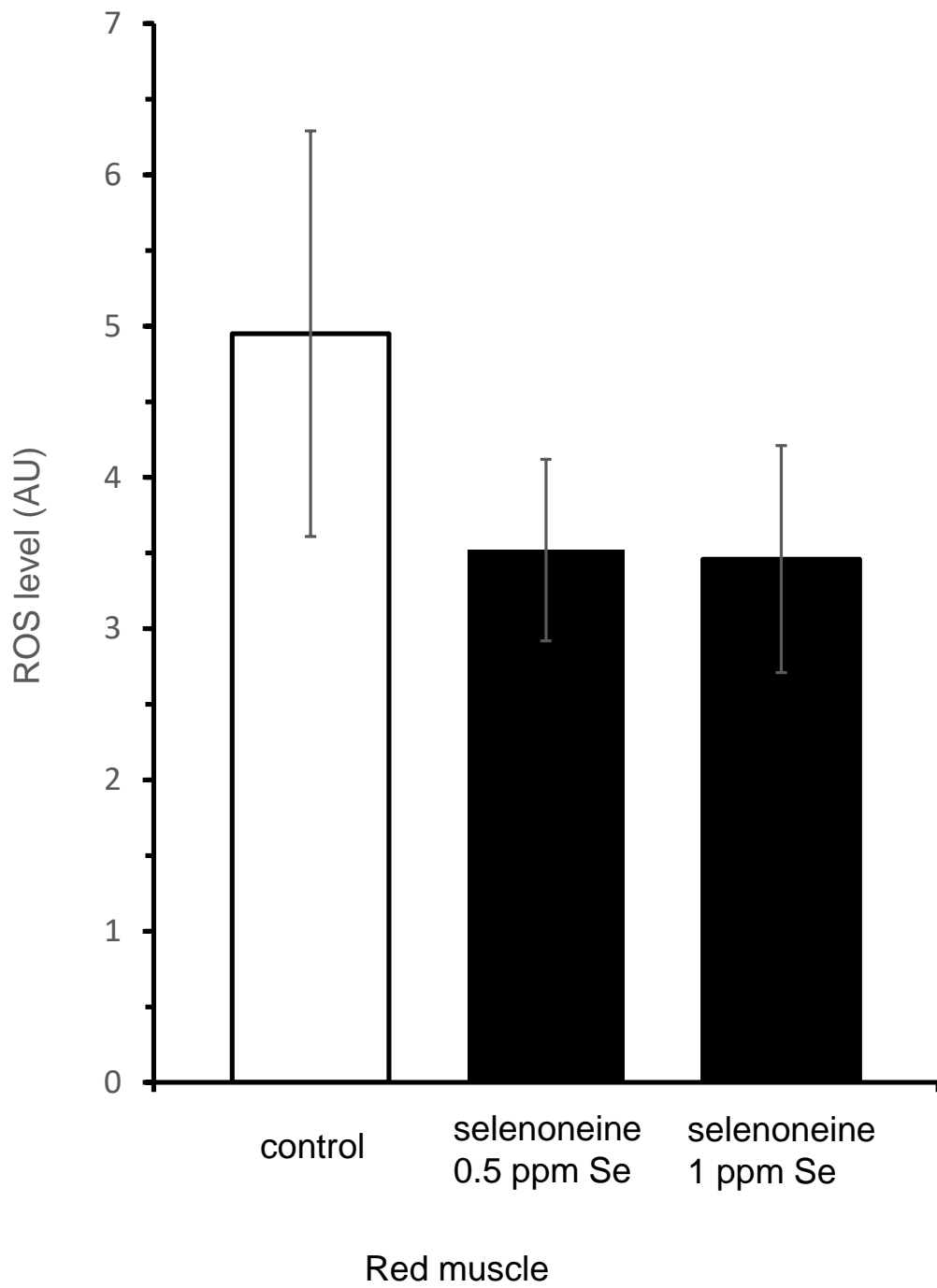


Figure 3
Tohfuku et al.

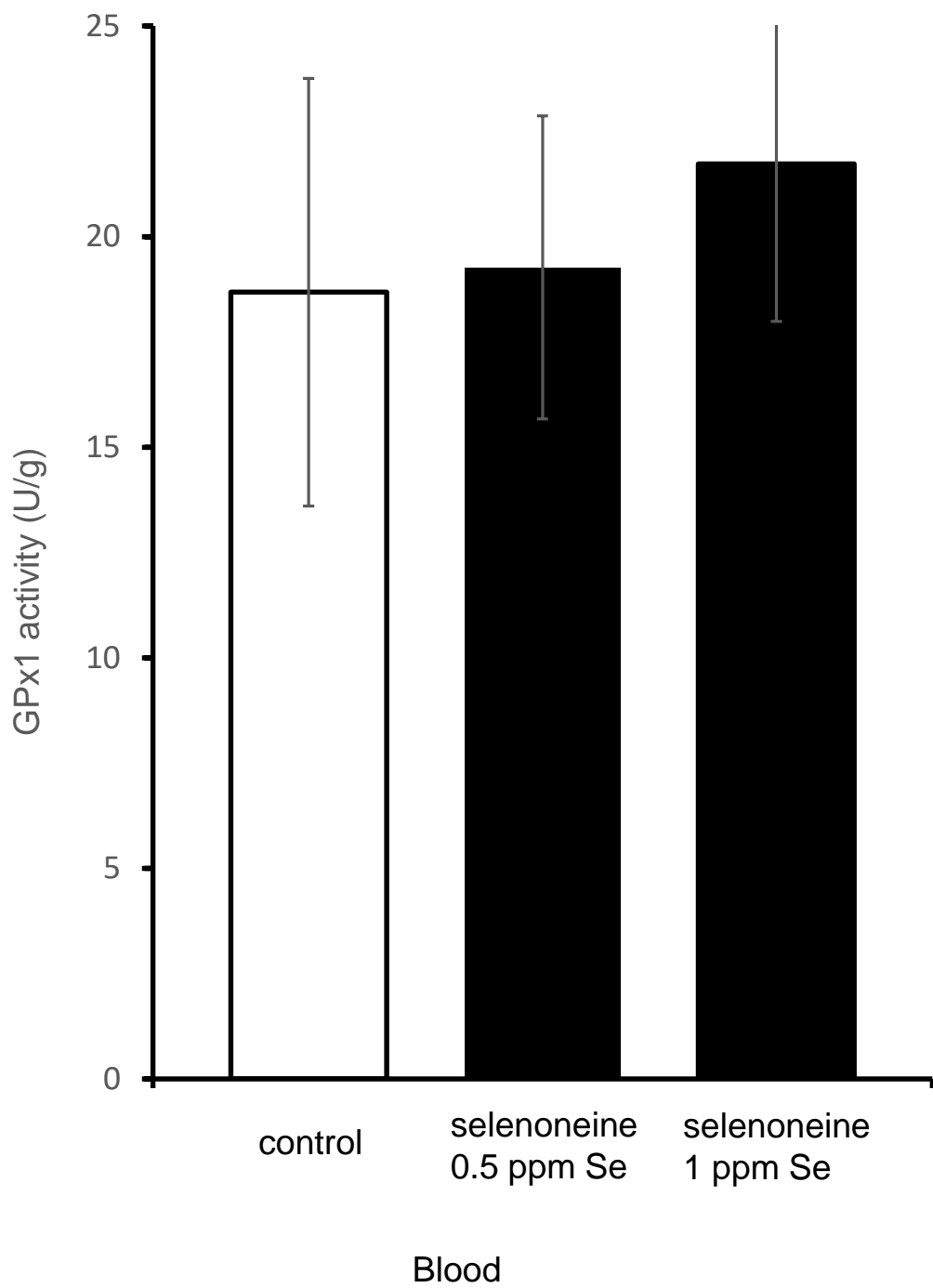


Figure 4
Tohfuku et al.